



Dartsch Scientific GmbH • Oskar-von-Miller-Str. 10 • D-86956 Schongau

Firma
Multikraft Produktions- und HandelsgmbH
Sulzbach 17

A-4632 Pichl/Wels

Dartsch Scientific GmbH
Institut für zellbiologische Testsysteme
Oskar-von-Miller-Straße 10
D-86956 Schongau

Fon +49 (0) 8861 256-5250
Fax +49 (0) 8861 256-7162
E-Mail info@dartsch-scientific.com
Internet www.dartsch-scientific.com

31. Mai 2010

– Testbericht und Fachinformation –

**Tierversuchsfreie zellbiologische Untersuchungen zu förderlichen
Wirkeffekten von TOPDRESS**

Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Mit tierversuchsfreien zellbiologischen Testmethoden wurde TOPDRESS aus der Produktpalette der Firma Multikraft Produktions- und HandelsgmbH aus A-4632 Pichl/Wels, Österreich, auf seine förderlichen Wirkeffekte untersucht. Die Testergebnisse haben gezeigt, dass das Futterzusatzmittel nicht nur den Zellstoffwechsel und damit die Zellerneuerung/-regeneration bzw. Zellvitalität erheblich steigert, sondern auch die schädigende Wirkung von exogenen Radikalen aus der Umwelt oder bei einem metabolischen Ungleichgewicht durch oxidativen Stress dosisabhängig reduziert. Ebenfalls sehr wirkungsstark ist TOPDRESS bei der Inaktivierung eines lokalen Überschusses endogen gebildeter Sauerstoffradikale, wie er beispielsweise im Gewebe nach Verletzungen oder im Verlauf von Entzündungen auftreten kann.

Somit hat sich TOPDRESS in den tierversuchsfreien experimentellen Untersuchungen bestens bewährt und kann daher für die vom Hersteller beschriebenen Anwendungsbereiche empfohlen werden.

Schongau, den 31. Mai 2010



Prof. Dr. Peter C. Dartsch

TOPDRESS – Testbericht

Allgemeine Eigenschaften

TOPDRESS ist ein Ergänzungsfuttermittel und dient als Futterzusatz zur Stärkung des Immunsystems. TOPDRESS ist ein sehr wertvoller Futterzusatzstoff, der vor allem aus Bioweizenkleie besteht und mit Multikraft Fermentiertem Kräuterextrakt und Zuckerrohrmelasse fermentiert wurde. Bei der Fermentation entstehen durch die Mikroorganismen viele Stoffwechselprodukte, die einen höheren Nährwert ergeben. TOPDRESS ist ein optimaler Futterzusatzstoff, welcher als tägliche Zugabe in der Fütteration bzw. als Zusatzfutter vor und in Stresssituationen angewendet wird. Es zeigte sich noch wirksamer als Multikraft Fermentierter Kräuterextrakt, da es durch den Fermentationsprozess mit Weizenkleie noch mehr Stoffwechselprodukte enthält. Als Futterzusatz steigert TOPDRESS die Fresslust, Futtermittelverwertung, Wohlbefinden und Widerstandskraft der Tiere.

Aus der Praxis wird über folgende Wirkungen von TOPDRESS berichtet:

- Das Immunsystem und die Widerstandskraft werden verbessert
- Die Schmackhaftigkeit des Futters wird gesteigert
- Weniger Stoffwechselprobleme treten auf (wie sie in den Fellwechselzeiten oft beobachtet werden)
- Ein glänzenderes, gleichmäßigeres Fell bildet sich; die Hufqualität wird verbessert
- Die positiven Mikroorganismen im Darm werden gefördert
- Durchfallprobleme werden aufgrund der stabilen Darmflora reduziert
- Der Wurmbefall wird verringert, krankheitserregende Keime im Kot werden weniger.
- Die Tiere werden ruhiger und ausgeglichener
- Die Fruchtbarkeit wird erhöht und die Futterkosten werden gesenkt

Quelle: <http://www.multikraft.com>

Testkonzentrationen

Die täglich empfohlene Menge für z.B. ein Großpferd (ca. 500 kg Körpergewicht) bei mittlerer Beanspruchung liegt bei ca. 200 g. Abhängig vom Trainingszustand hat ein Pferd mit diesem Körpergewicht etwa 40 Liter Blut; Sport- und Rennpferde sogar 50 Liter. 40% des Blutvolumens verteilt sich dabei auf die zellulären Bestandteile des Blutes (der Hämatokrit liegt beim Pferd bei 33 bis 45%) und umfasst in erster Linie die Erythrozyten (rote Blutkörperchen), welche für den Sauerstofftransport im Blut verantwortlich sind. Somit verteilen sich – bei einer angenommenen 100%igen Wirkstoffresorption – die 200 g TOPDRESS aus der Fütterungsempfehlung auf etwa 30 Liter Blutflüssigkeit. Rechnet man dies auf ein Volumen von einem Milliliter um, so beträgt die so erhaltene Konzentration etwa 5 mg/ml. Die Untersuchungen wurden daher im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 10 mg/ml durchgeführt. Dabei bezeichnet die Konzentration „0“ die unbehandelte Kontrolle.

TOPDRESS – Testbericht

Bei Ansatz der jeweils 10fach-konzentrierten Stammlösungen wurde TOPDRESS im Lösemittel (Phosphatpuffer) nach der Einwaage gut gemörsert, gevortext und vor dem Pipetieren etwa 3 min stehen gelassen. Für die Untersuchungen verwendet wurde der sich so ergebende weitgehend klare und braun gefärbte wässrige Überstand.

Fragestellungen der durchgeführten Untersuchungen

Eine ganze Reihe der mit erhöhtem psychischen und physischen Stress einhergehenden unerwünschten Folgeerscheinungen basieren unter anderem auch auf einem Überschuss an reaktiven Sauerstoffradikalen – unabhängig, ob sie von außen auf den Organismus einwirken oder von innen durch ein Ungleichgewicht im Stoffwechsel.

Im Einzelnen wurde folgenden Fragestellungen nachgegangen:

- Kann durch TOPDRESS der Energiestoffwechsel von Bindegewebszellen stimuliert und so eine Zellerneuerung/regeneration bzw. -vitalisierung gefördert werden?
- Kann TOPDRESS einen Überschuss der im Blut zirkulierenden freien reaktiven Sauerstoffradikale neutralisieren und somit einer Schädigung des Organismus durch äußere (exogene) Umwelteinflüsse und/oder oxidativem Stress aufgrund eines Ungleichgewichts im Stoffwechsel vorbeugen?
- Kann TOPDRESS endogene und lokal im Gewebe gebildete überschüssige Sauerstoffradikale inaktivieren? Ein solcher Radikalüberschuss direkt im Gewebe kann beispielsweise nach Verletzungen oder bei Entzündungsprozessen durch die aus dem Blut eingewanderten neutrophilen Granulozyten als entzündungsvermittelnde Zellen hervorgerufen werden.

Zur Klärung dieser Fragestellungen wurde TOPDRESS mit drei verschiedenen tierversuchsfreien zellbiologischen Testverfahren untersucht. Alle drei Testverfahren werden in dieser Form schon über mehrere Jahre hinweg erfolgreich durchgeführt und haben zu zahlreichen Veröffentlichungen in internationalen Fachjournalen geführt.

Trotz der Limitierung, dass die Testverfahren nicht das Verhalten des Gesamtorganismus, sondern nur Teilaspekte des Stoffwechsels erfassen können, sind sie inzwischen ein wichtiges Kriterium geworden, um das Potenzial von Wirkstoffen oder Wirkstoffgemischen ermitteln, bewerten und vergleichen zu können.

TOPDRESS – Testbericht

Wirkung auf den Energiestoffwechsel von kultivierten Bindegewebszellen

Zellregenerative Vorgänge oder Wundheilungsprozesse sind u.a. durch eine zeitweilige Erhöhung des Energiestoffwechsels der beteiligten Zellen charakterisiert. Ist ein Wirkstoff / Wirkstoffgemisch in der Lage, den zellulären Energiestoffwechsel zu stimulieren, so kann daraus gefolgert werden, dass dieser Wirkstoff auch die Zellregeneration und Zellvitalität fördern kann.

Für diese Untersuchung wurden Bindegewebsfibroblasten (Zelllinie L-929, DSMZ) in einer Dichte von 20.000 Zellen/Vertiefung in 96-Loch-Platten ausgesät. Nach 48 Stunden, welche die Zellen zur Adhäsion und zur Normalisierung ihres Stoffwechsels brauchen, wurden sie durch die Zugabe von Phosphatpuffer mit Calcium und Magnesium und 10 mM Glucose stimuliert. Der Energiestoffwechsel mit seinen verschiedenen Redoxprozessen führt dabei zu einer Spaltung / Farbumschlag und damit auch einer Änderung der optischen Dichte des ebenfalls zum Ansatz zugegebenen wasserlöslichen Tetrazoliumfarbstoffes WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim). Dessen optische Dichte wurde als Differenzmessung $\Delta OD = 450 - 690 \text{ nm}$ kontinuierlich für 180 min aufgezeichnet und nach linearer Regression der erhaltenen Kurvenzüge in Form der Steigung (Zeitintervall: 30 bis 120 min) in mOD/min ausgewertet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden dann als Relativwerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt und gegen die Konzentration aufgetragen.

Ergebnis (Abb. 1): Es wurde eine ausgeprägte dosisabhängige Förderung des Energiestoffwechsels von Bindegewebszellen durch TOPDRESS festgestellt. Der maximale förderliche Effekt lag im Bereich der für ein Großpferd berechneten Blutflüssigkeitskonzentration von 5 mg/ml bei einer mehr als doppelt so hohen Stimulation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Durch diese stimulierende Wirkung kann es nach Wirkstoffaufnahme zu einer verbesserten Zellerneuerung/-regeneration und -vitalität in vivo kommen.

Antioxidative Wirkungen

Ohne Sauerstoff können wir nicht leben, aber Sauerstoff in Form von hochreaktiven freien Sauerstoffradikalen (ROS = Reactive Oxygen Species) kann pathophysiologische Veränderungen bewirken und auch den vorzeitigen Alterungsprozess fördern.

Freie Radikale werden als natürliche Stoffwechselprodukte permanent in unserem Körper produziert und erfüllen grundsätzlich lebenswichtige Aufgaben. Zudem stehen sie in einem ständigen Gleichgewicht mit den regulierenden natürlichen Entgiftungsmechanismen wie die Enzyme Glutathion, Katalase und Superoxid-Dismutase. Umweltbelastungen, Ernährungsmängel, körperlicher oder seelischer Stress, aber auch Medikamente, Verletzungen

TOPDRESS – Testbericht

und Entzündungen können zu einer unkontrollierten Überproduktion freier Radikale führen. Die Selbstregulation durch den Körper ist gestört.

Übersteigt die Bildung freier Radikale deren körpereigene Entgiftung, so spricht man von „oxidativem Stress“. Die schnell und aggressiv wirkenden freien Radikale stören und zerstören wichtige Funktionen und Strukturen im Körper; sie können oxidative Veränderungen verursachen und damit Schädigungen aller wichtigen Biomoleküle wie Nukleinsäuren (DNA und RNA), Proteine, Lipide und Kohlenhydrate.

Antioxidative Wirkung im zellfreien Testsystem bei freien Radikalen

In diesem zellfreien Testsystem wurde ohne die Verwendung von Zellen im Testansatz überprüft, ob verschiedene Konzentrationen der Testsubstanz in der Lage sind, freie Sauerstoffradikale zu inaktivieren, welche von außen (exogen) einwirken oder frei im Blut zirkulieren

Für die Untersuchung wurden die verschiedenen Konzentrationen von TOPDRESS in Phosphatpuffer vorgelegt und dazu eine Lösung von Kaliumsuperoxid in Aqua dest. (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) pipettiert. Die nicht durch den Wirkstoff inaktivierten und damit noch aggressiven und reaktionsfreudigen Radikale führen dabei zu einer Spaltung und damit auch einer Änderung der optischen Dichte des ebenfalls zum Ansatz zugegebenen wasserlöslichen Tetrazoliumfarbstoffes WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim). Dessen optische Dichte wurde als Differenzmessung $\Delta OD = 450 - 690 \text{ nm}$ kontinuierlich aufgezeichnet und nach linearer Regression der erhaltenen Kurvenzüge in Form der Steigung (Zeitintervall: 0 bis 10 min) in mOD/min ausgewertet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden dann als Relativwerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt und gegen die Konzentration aufgetragen.

Ergebnis (Abb. 2): In diesem Versuch zeigte TOPDRESS eine ausgeprägte dosisabhängige Inaktivierung exogener freier Sauerstoffradikale im zellfreien Testsystem. Im Bereich der für ein Großpferd berechneten Blutflüssigkeitskonzentration von 5 mg/ml konnte TOPDRESS annähernd 100% der freien Radikale inaktivieren. Aus Vergleichsgründen wird in der Wissenschaft gerne ein EC50-Wert angegeben, d.h. der Wert für die Testkonzentration, bei der die Hälfte der Radikale inaktiviert wird. Mit diesem Wert kann man die Effizienz verschiedener Wirkstoffe oder Formulierungen miteinander vergleichen. Die EC50 in diesem Versuch lag für TOPDRESS bei etwa 1,5 mg/ml. Im direkten Vergleich wurde für die bekanntermaßen stark antioxidativ wirkende Ascorbinsäure (Vitamin C) in diesem Versuch eine EC50 von 1,3 mg/ml ermittelt (nicht dargestellt). Durch die antioxidative Wirkung können frei im Blut zirkulierende Radikale, welche aus der Umwelt stammen oder durch ein

TOPDRESS – Testbericht

metabolisches Ungleichgewicht (z.B. oxidativer Stress) entstehen, durch die Gabe von TOPDRESS sehr gut inaktiviert werden.

Antioxidative Wirkung im zellbasierten Testsystem bei einem lokalen Überschuss körpereigener (endogener) Sauerstoffradikale

Zunächst wurden humane Promyelozyten (Zelllinie HL60, ECACC 98070106) als permanente Zelllinie in Routinekultur durch sechstägige Behandlung mit Dimethylsulfoxid zu sog. funktionalen neutrophilen Granulozyten differenziert. Dies sind Zellen, welche die Eigenschaften von phagozytierenden und entzündungsvermittelnden Zellen im Blut besitzen. Diese differenzierten Zellen wurden durch Zugabe eines Phorbolesters (Phorbol-12-myristat-13-acetat; Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) dazu angeregt, Superoxidanion-Radikale zu bilden. Die Radikale führen zu einer Spaltung des ebenfalls dem Versuchsansatz zugesetzten Tetrazoliumfarbstoffes WST-1. Dabei ist die Menge der gebildeten Sauerstoffradikale direkt proportional zur Farbstoffspaltung, d.h. je mehr reaktive Radikale vorhanden sind, desto stärker ist die Farbstoffspaltung und damit auch die Änderung der optischen Dichte. Werden die von den Zellen gebildeten Radikale durch den Wirkstoff inaktiviert, so verändert sich die optische Dichte weniger stark. Es wurde die optische Dichte als Differenzmessung $\Delta OD = 450 - 690 \text{ nm}$ kontinuierlich aufgezeichnet und nach linearer Regression der erhaltenen Kurvenzüge in Form der Steigung (Zeitintervall: 10 bis 30 min) in mOD/min ausgewertet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden dann als Relativwerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt und gegen die Konzentration aufgetragen.

Ergebnis (Abb. 3): Auch in diesem Versuch zeigte TOPDRESS eine deutliche dosisabhängige Inaktivierung von endogenen Sauerstoffradikalen, welche in einem zellbasierten Test von den entzündungsvermittelnden Zellen gebildet wurden. Diese endogenen Radikale entstehen bei Entzündungsprozessen oder nach Gewebeverletzungen im Überschuss und können zu weiteren Schädigungen des Gewebes führen. Bei der für ein Großpferd berechneten Blutflüssigkeitskonzentration von 5 mg/ml wurde eine annähernd 90%ige Entgiftung der endogenen Radikale erzielt. Die EC₅₀, d.h. die Wirkstoffkonzentration, welche die endogenen Sauerstoffradikale zu 50% inaktiviert, lag ebenfalls bei etwa 1,5 mg/ml. So kann durch TOPDRESS die schädigende Wirkung von einem lokalen Überschuss reaktiver Sauerstoffradikale direkt im Gewebe erheblich vermindert werden.

TOPDRESS – Testbericht

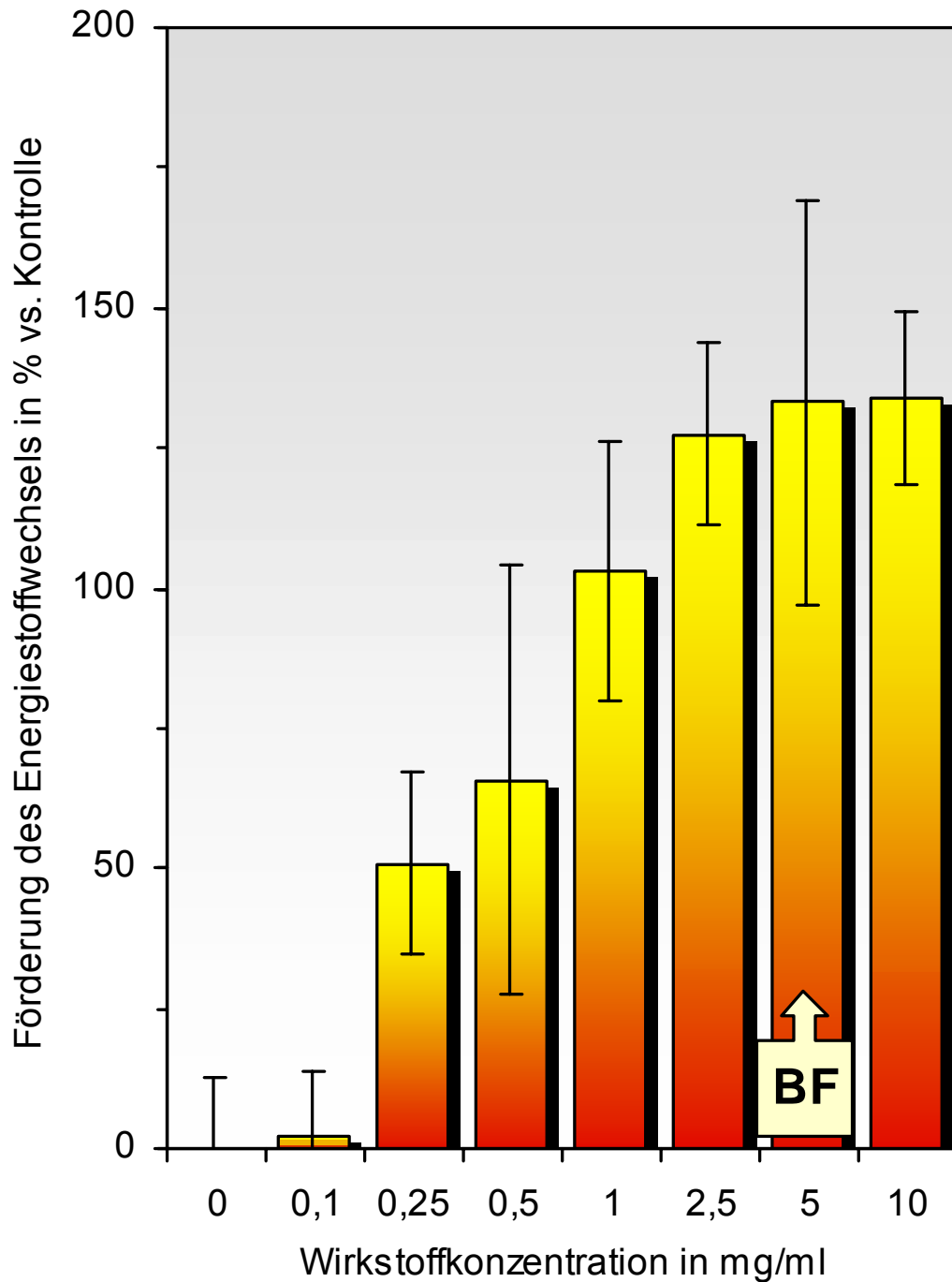


Abb. 1: Dosisabhängige Förderung des Energiestoffwechsels von Bindegewebszellen durch TOPDRESS. Der maximale förderliche Effekt liegt im Bereich der für ein Großpferd berechneten Blutflüssigkeitskonzentration von 5 mg/ml bei einer mehr als doppelt so hohen Stimulation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Durch diese stimulierende Wirkung kann es nach Wirkstoffaufnahme zu einer verbesserten Zellerneuerung/-regeneration und -vitalität in vivo kommen. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus jeweils drei Messungen ($n = 3$). Bereits bei TOPDRESS-Konzentrationen $\geq 0,25$ mg/ml kommt es zu einer statistisch signifikanten Stimulation ($p \leq 0.05$; Student's t -Test).

TOPDRESS – Testbericht

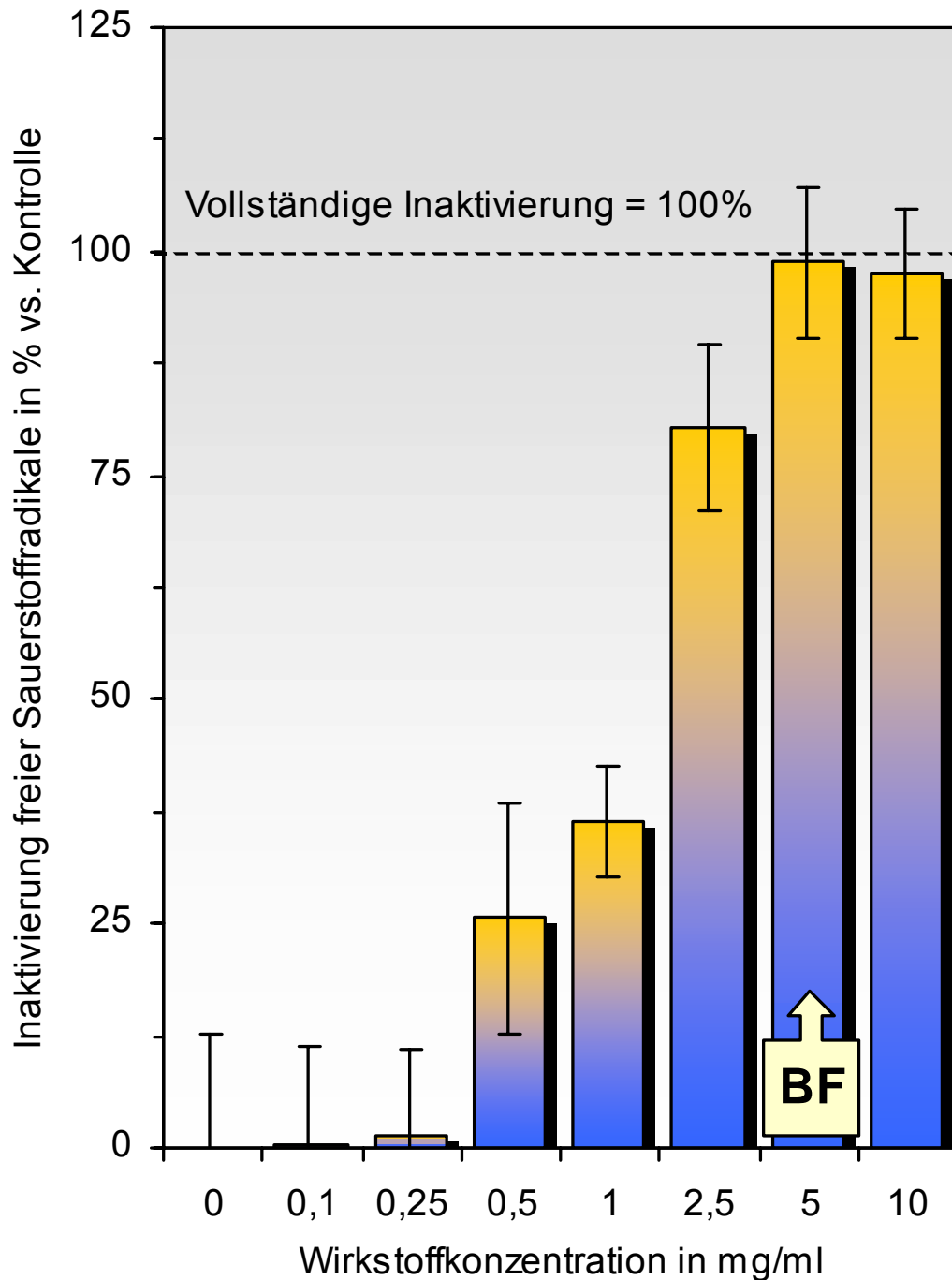


Abb. 2: Dosisabhängige Inaktivierung exogener freier Sauerstoffradikale durch TOPDRESS im zellfreien Testsystem. Eine vollständige Inaktivierung ergibt einen Wert von 100%. Es ist leicht zu erkennen, dass TOPDRESS bei der für ein Großpferd berechneten Blutflüssigkeitskonzentration (BF) von 5 mg/ml annähernd 100% der freien Radikale inaktiviert und so eine ausgeprägte antioxidative Wirkung hat. Die EC50, d.h. die Wirkstoffkonzentration, bei der es zu einer 50%igen Inaktivierung der freien Radikale kommt, liegt bei etwa 1,5 mg/ml. Durch die antioxidative Wirkung können frei im Blut zirkulierende Radikale, welche aus der Umwelt stammen oder durch ein metabolisches Ungleichgewicht entstehen, inaktiviert werden. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus jeweils drei Messungen ($n = 3$). Bei TOPDRESS-Konzentrationen ≥ 1 mg/ml kommt es zu einer statistisch signifikanten Inaktivierung der Radikale ($p \leq 0.05$; Student's t -Test).

TOPDRESS – Testbericht

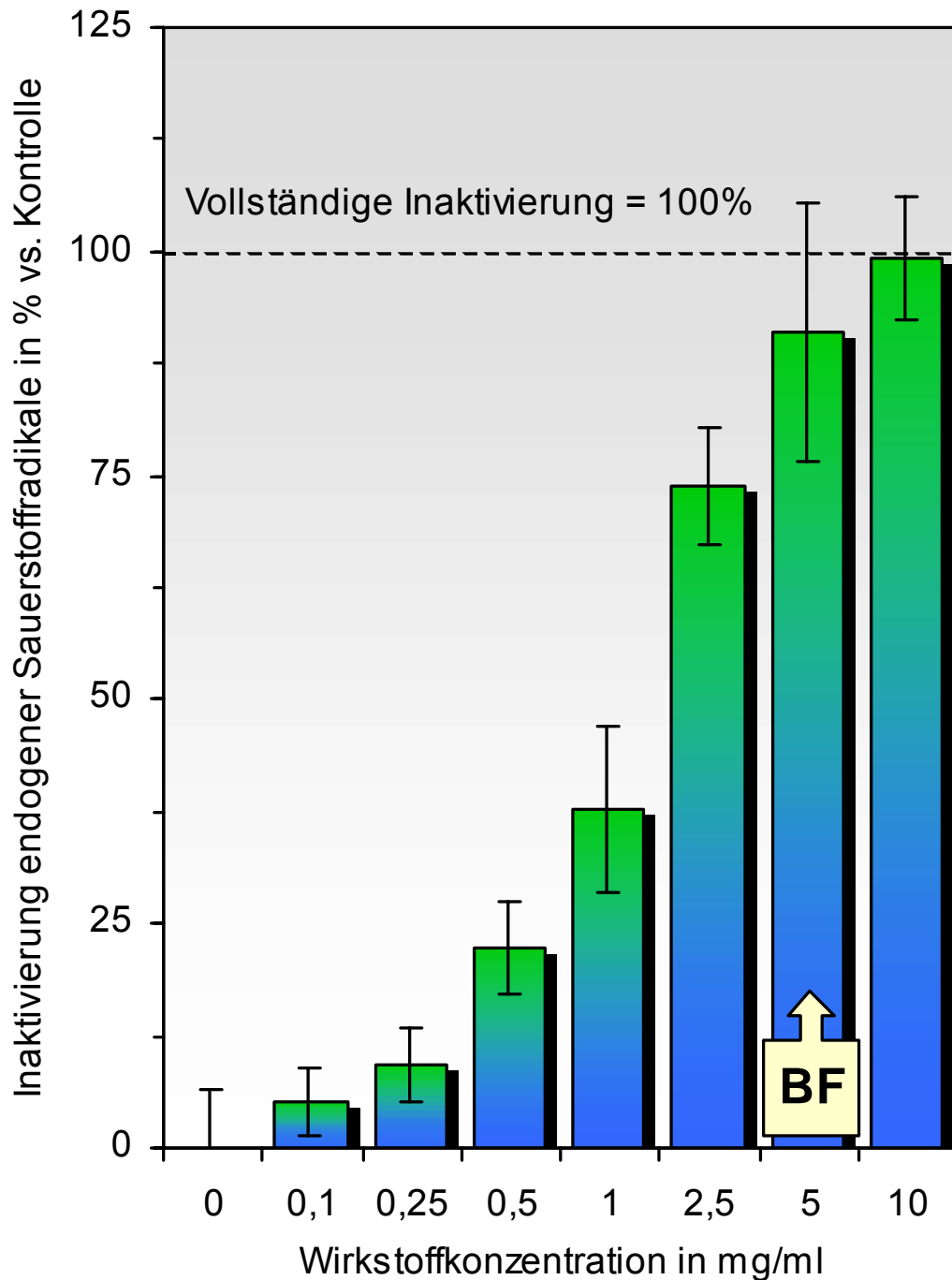


Abb. 3: Dosisabhängige Inaktivierung von endogenen Sauerstoffradikalen durch TOPDRESS, welche in einem zellbasierten Test von speziell differenzierten entzündungsvermittelnden Zellen (funktionale neutrophile Granulozyten) in einem oxidativen Burst gebildet werden. Bei der für ein Großpferd berechneten Blutflüssigkeitskonzentration (BF) von 5 mg/ml wird eine annähernd 90%ige Entgiftung der Radikale erzielt. Die EC50, d.h. die Wirkstoffkonzentration, welche die endogenen Sauerstoffradikale zu 50% inaktiviert, liegt bei etwa 1,5 mg/ml. So kann durch TOPDRESS die schädigende Wirkung von einem lokalen Überschuss reaktiver Sauerstoffradikale direkt im Gewebe erheblich vermindert werden. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus jeweils drei Messungen ($n = 3$). Bei TOPDRESS-Konzentrationen $\geq 0,5$ mg/ml kommt es zu einer statistisch signifikanten Inaktivierung der Radikale ($p \leq 0.05$; Student's t -Test).